

· 论 著 ·

# 21 羟化酶缺乏症高风险胎儿的产前诊断分析

严爱贞, 郑德柱, 曾 健, 王志红, 兰风华

**[摘要]** 目的 对 1 例 21 羟化酶缺乏症(21OHD)先证者家系 CYP21A2 基因缺陷高风险胎儿进行产前分子诊断。方法 提取先证者及其父母的外周血 DNA,分段扩增 CYP21A2 基因全长并测序,确定先证者及父母基因型。采用亲子鉴定试验排除母体 DNA 污染。针对先证者突变位点,扩增羊水 DNA 并测序。**结果** 测序结果显示先证者存在 IVS2-13A > G 纯合突变,父母均为携带者。比较 STR 位点未见羊水 DNA 受母体 DNA 污染迹象。胎儿为该突变杂合子,判断胎儿为携带者。培养后羊水检测结果与培养前一致。胎儿娩出后发育良好,证实了产前诊断结果。**结论** 建立了 21OHD 产前分子诊断方法,并成功应用于 1 例 21OHD 高风险胎儿的产前诊断分析。

**[关键词]** 21 羟化酶缺乏症;CYP21A2 基因;产前诊断;短串联重复序列位点

**[中图分类号]** R714.5 **[文献标志码]** A doi:10.3969/j.issn.1672-271X.2013.06.007

## Prenatal molecular diagnosis of a fetus at high risk for 21-hydroxylase deficiency

YAN Ai-zhen, ZHENG De-zhu, ZENG Jian, WANG Zhi-hong, LAN Feng-hua. Center for Molecular Diagnosis of Genetic Diseases, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Command, Fuzhou, Fujian 350025, China

**[Abstract]** **Objective** To perform prenatal molecular diagnosis on a fetus at high risk for 21-hydroxylase deficiency. **Methods** Genomic DNA was extracted from peripheral blood of proband and the parents. The coding region of CYP21A2 gene was amplified in segments by polymerase chain reaction(PCR) to confirm the genotype of proband and the parents. Paternity test was applied to exclude the possibility of maternal genomic DNA contamination. After confirming the mutation of the proband, PCR amplification of CYP21A2 gene was carried out by using fetal DNA and the PCR products were sequenced directly. **Results** The sequencing results showed that a homozygous mutation of IVS2-13A > G was detected in the CYP21A2 gene of the proband and the parents were the 21OHD carriers. By comparing short tandem repeat(STR) sites, contamination of maternal genomic DNA was not found in fetal DNA. IVS2-13A > G mutation was found in one allele of the fetus by direct sequencing and he was judged as a 21OHD carrier. The detection results of amniotic fluid cell(AFC) before and after culture were identical. The fetus was healthy after birth, consistent with the result of the prenatal molecular diagnosis. **Conclusion** A method for molecular prenatal diagnosis of 21OHD was established and successfully applied to the prenatal diagnosis of a fetus at high risk for 21-hydroxylase deficiency.

**[Key words]** 21-hydroxylase deficiency; CYP21A2 gene; prenatal diagnosis; STR sites

先天性肾上腺皮质增生症(congenital adrenal hyperplasia, CAH)是一组肾上腺皮质激素合成途径中酶缺陷所致的常染色体隐性遗传病,在新生儿中发生率为 1/5000<sup>[1]</sup>,是导致新生儿两性畸形的最常见原因,其中 90%~95%的 CAH 患者存在 21 羟化酶缺陷<sup>[2]</sup>。临床研究表明,在妊娠早期进行治疗可以有效改善胎儿外生殖器发育状况<sup>[3-4]</sup>。产前分子诊断既是宫内治疗的前提,也是防止该病患儿出生的有效措施。本文对 1 例有 21-羟化酶缺乏症(21-hydroxylase deficiency, 21OHD)孕产史的家系再妊娠高风险胎儿进行产前分子诊断,报告如下。

## 1 对象与方法

作者单位: 350025 福建福州,南京军区福州总医院遗传病分子诊断中心

通讯作者: 兰风华, E-mail: fhlan009@qq.com

**1.1 一般资料** 先证者,社会性别女,河南荥阳人,2009 年 11 月足月顺产,该患者出生时即有阴蒂肥大,肾上腺 CT 检查未见异常;B 超可见子宫、阴道;骨龄片可见骨化核;电解质检测正常;血 17-羟孕酮:12.73 nmol/L[参考值(0.7 ± 0.3) nmol/L]。染色体核型为 46,XX,未检测到 Y 染色体男性发育相关基因。入院诊断:女性假两性畸形;21OHD。经本实验室进行 CYP21A2 基因(21OHD 致病基因)突变分析,证实该患者为 IVS2-13A > G 纯合突变,父母均为相同突变杂合子。其母亲于 2012 年 1 月又一次怀孕,胎儿及孕妇体检未见异常,在了解到所怀胎儿具有患 21OHD 的高风险后,要求对胎儿进行 21OHD 的产前分子诊断。

**1.2 试剂和仪器** 羊水 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),AmininMAX 羊水培养基(上海 Invitrogen 公司),PCR 通用试剂盒、DNA 分子量标准(DNA

Ladder, 日本 TaKaRa 公司), DNA 胶回收试剂盒(日本 Bio-flux 公司), 亲子鉴定试剂盒(美国 ABI 公司), Power/pac200 型凝胶电泳仪(美国 BIO-RAD 公司), WD-9413B 凝胶成像仪(北京六一仪器厂), Model5410 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Napco 公司), 3130 型遗传分析仪、2720 型 PCR 仪(美国 ABI 公司)。

1.3 方法

1.3.1 羊水的采集、培养及 DNA 的提取 孕妇产于妊娠 16 周时,由产科医师在 B 超引导下抽取羊水 30 ~40 ml,置无菌容器中送检,离心后,取部分沉渣,提取基因组 DNA;另一部分,加入适量培养基,置 37 ℃、5% CO<sub>2</sub> 环境培养 7 ~10 d 后,提取基因组 DNA<sup>[5]</sup>。

1.3.2 先证者及父母基因突变查找 提取先证者及父母外周血 DNA,参照文献方法<sup>[6]</sup>进行 PCR 扩增。引物(表 1) 委托上海生工合成,扩增 CYP21A2 基因全部外显子及启动子区。PCR 产物经电泳后回收送上海生工测序。

1.3.3 短串联重复序列( short tandem repeat, STR) 位点分析 取羊水 DNA、胎儿父母及先证者的外周血 DNA,按试剂盒说明书进行 PCR 扩增,产物在 3130 型遗传分析仪上检测,用 GeneMapper 4.0 软件分析 STR 位点,以评估母体 DNA 污染<sup>[7-8]</sup>。

1.3.4 胎儿基因突变检测 在排除母体 DNA 污染的基础上,根据先证者突变所在位置,对羊水 DNA 进行 PCR 扩增并测序。

表 1 CYP21A2 基因的 PCR 扩增引物

片段	引物序列 (5'—3')	退火温度(℃)
AF	TGCATTTCCCTTCCTTGCTTC	58
AR	CTGAGGTGCCACTTATAGCTC	
BF	TTTTGTTCTTCAGGCGATTCA	
BR	TCCAGAGCAGGGAGTAGTCTC	58
CF	CCGGACCTGTCTTGGGAGACTACT	
CR	CTGAGTGGCTGGGTGAAATGGAACA	62

2 结 果

2.1 先证者及父母 CYP21A2 基因测序分析 对先证者 CYP21A2 基因的 PCR 产物测序显示:先证者存在 IVS2-13A > G 纯合突变(图 1D),其父母亲均为该突变杂合子(图 1B-C)。结果亦经反向测序证实。

2.2 胎儿 CYP21A2 基因序列分析 胎儿羊水 DNA 测序显示:在与先证者同一位置上存在 IVS2-13A > G 杂合突变,为 21OHD 携带者(图 1E-F),胎儿羊水培养前后测序结果一致,且结果经反向测序证实。

2.3 STR 分析结果 比对胎儿及其父母 STR 基因型,结果显示,羊水 DNA 来自独立个体,其母亲独有的 6 个 STR 位点,均未在羊水 DNA 中出现,同时性别位点显示胎儿为男性(图 2)。

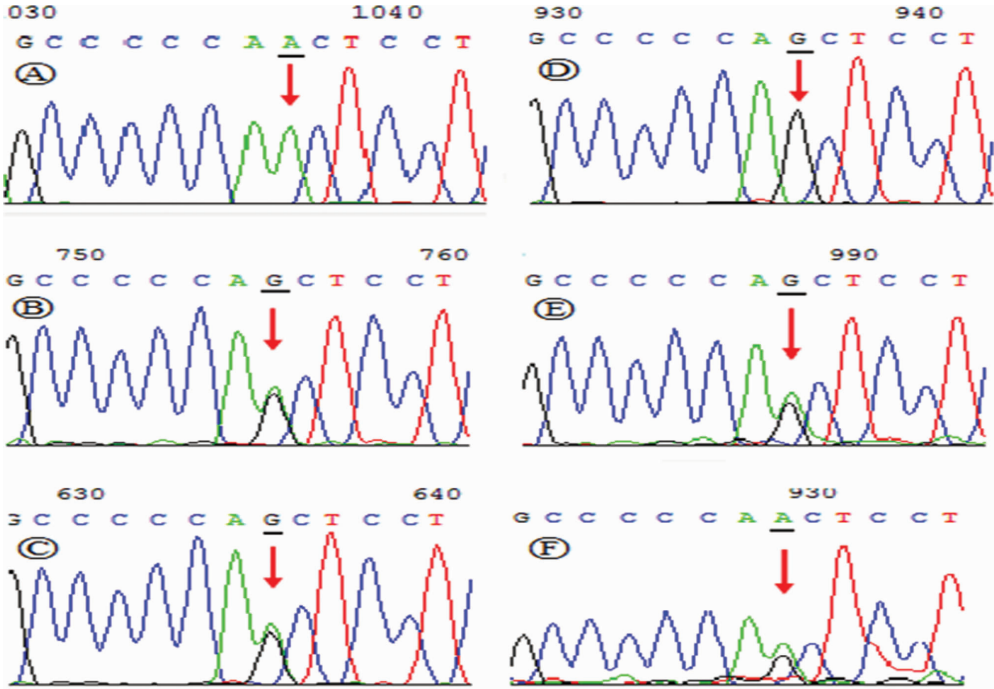


图 1 CYP21A2 基因测序结果

A: 无关对照 CYP21A2 基因部分测序图;B、C:先证者父亲、母亲部分测序图;D:先证者部分测序图;E、F:羊水培养前、后部分测序图。(红色箭头示突变碱基处)

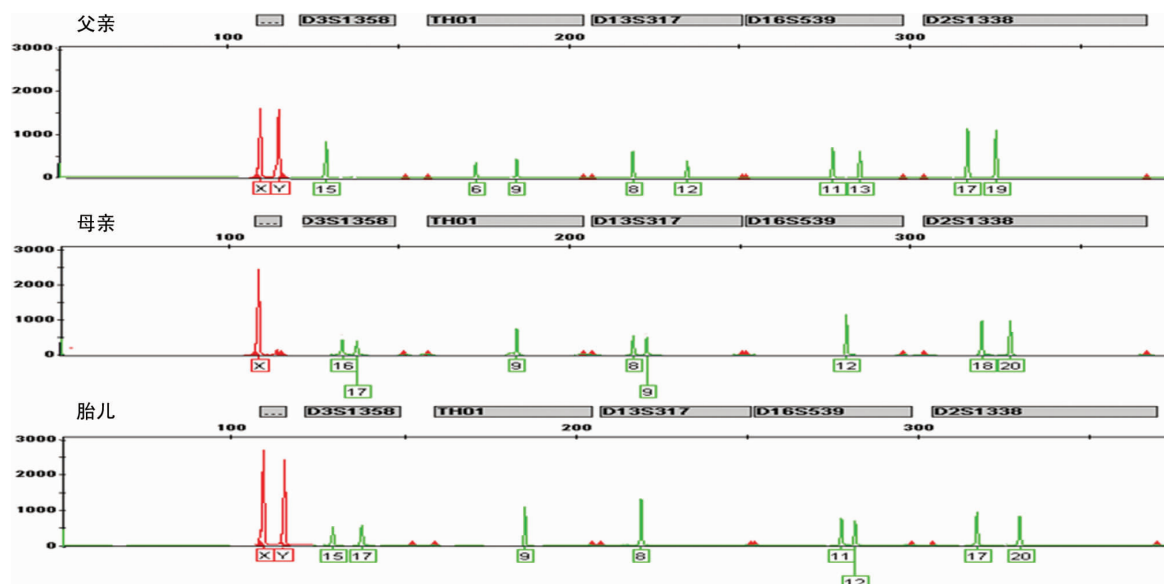


图 2 家系部分 STR 位点

经比对 AFC 中有一半等位基因来源于父亲,另一半来源于母亲

### 3 讨论

21OHD 的致病基因 (CYP21A2) 定位于人类 6 号染色体短臂 6p21.3 的 HLA III 基因聚集区,该区域同时存在相应的无活性假基因 (CYP21P),与真基因 CYP21A2 同源性高达 98%<sup>[9]</sup>。现今发现的 CYP21A2 基因突变有 159 种,但只有极少数关于中国人群的报道。21OHD 的临床表现复杂多样,不同的基因缺陷对酶活性的影响也不同,导致临床表现的差异。本文中先证者 IVS2-13A > G 突变发生在第 2 内含子 3' 端剪接受位,属于剪接受突变,将引起 mRNA 剪接受异常,阅读框架改变,致使酶活性降低,临床表现为单纯男性化型<sup>[10]</sup>。

2000 年台湾报道了首例中国人 CAH 的产前诊断<sup>[11]</sup>,大陆仅见个别报道<sup>[12]</sup>。本研究中首先对先证者进行家系调查,确认父母非近亲结婚后,再确定先证者的基因突变位点。利用亲子鉴定方法,排除羊水 DNA 中母体 DNA 污染后,经检测确认胎儿存在与其父母一样的杂合突变,且羊水培养前后检测结果一致。由于该病为隐性遗传病,杂合子不发病,胎儿母亲决定继续妊娠至分娩。回访胎儿娩出后发育良好,证实了产前诊断结果。

21-羟化酶缺陷症是一个能够进行产前治疗的遗传性疾病。研究证明,宫内治疗对女性患儿治疗有效率可达 85%,可显著减轻或消除新生儿外生殖器畸形症状<sup>[3]</sup>。因此,胎儿性别确定是本病产前治疗的重要前提。本实验中通过检测 16 个 STR 位点 (含 1 个性别位点) 来排除母体 DNA 污染。虽然国

内外已有应用 STR 位点分析排除母体 DNA 污染的报道<sup>[13-14]</sup>,但大多只选择 2 ~ 3 个位点进行分析。本实验室将亲子鉴定实验中的 16 个 STR 位点用于遗传病产前分子诊断<sup>[5,8]</sup>,该方法具有以下几个优势:①由于 STR 位点更多,能更全面的反映羊水 DNA 受母体 DNA 污染的情况;②判断羊水 DNA 样本是否来自独立个体;③对胎儿性别的检测,可以指导临床宫内治疗;④通过鉴定家系间成员的亲缘关系,判断突变基因的来源,发现新生突变。因此该方法被欧美国家许多分子诊断实验室所采用<sup>[15]</sup>。

### 【参考文献】

- [1] Yu Y, Wang J, Huang X, et al. Molecular characterization of 25 Chinese pedigrees with 21-hydroxylase deficiency [J]. Genet Test Mol Biomarkers, 2011, 15 (3): 137-142.
- [2] Forest MG. Recent advances in the diagnosis and management of congenital adrenal hyperplasia due to 21 hydroxylase deficiency [J]. Hum Reprod Update, 2004, 10 (6): 469-485.
- [3] Ghizzoni L, Cesari S, Cremonini G, et al. Prenatal and early post-natal treatment of congenital adrenal hyperplasia [J]. Endocr Dev, 2007, 11: 58-69.
- [4] Hindmarsh PC. Management of the child with congenital adrenal hyperplasia [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2009, 23: 193-208.
- [5] 黄梁许, 黄惠娟, 杨渤生, 等. 肾上腺脑白质营养不良的产前分子诊断 [J]. 中华医学遗传学杂志, 2005, 22 (6): 612-615.
- [6] Yokoyama Y, Teraoka M, Tsuji K, et al. Rapid screening method to detect mutations in CYP21, the gene for 21-hydroxylase [J]. Am J Med Genet, 2000, 94 (1): 28-31.
- [7] 柯龙凤, 王志红, 黄惠娟, 等. X-连锁肾上腺脑白质营养不良高风险胎儿的产前分子诊断 [J]. 中华妇产科杂志, 2008, 43 (1): 25-28.

[8] 兰风华,黄梁浒,杨渤生. 肾上腺脑白质营养不良的分子诊断与分子机制[J]. 东南国防医药,2005,7(5):321-323.

[9] Wedell A. Congenital adrenal hyperplasia[J]. Clin Biochem, 2011,44(7):505-506.

[10] Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, et al. Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1994,78(5):1145-52.

[11] Lee HH, Kuo JM, Chao HT, et al. Carrier analysis and prenatal diagnosis of congenital adrenalpherplasia caused by 21-hydroxylase deficiency in chinese[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2000,85:597-600.

[12] 崔英霞,夏欣一,史铁超. 先天性肾上腺皮质增生风险胎儿的 CYP21 基因分子产前诊断[J]. 现代检验医学杂志, 2009,24

(5):15-18.

[13] Ying XC, Xin YX, Ying B, et al. Rapid molecular prenatal diagnosis of spondyloepiphyseal dysplasia congenita by PCR-SSP assay[J]. Genet Test, 2008,12(4):533-536.

[14] Winsor EJ, Akoury H, Chitayat D, et al. The role of molecular microsatellite identity testing to detect sampling errors in prenatal diagnosis[J]. Prenat Diagn, 2010,30(8):746-752.

[15] Schrijver I, Cherny SC, Zehnder JL. Testing for maternal cell contamination in prenatal samples: a comprehensive survey of current diagnostic practices in 35 molecular diagnostic laboratories[J]. J Mol Diagn, 2007,9(3):394-400.

(收稿日期:2013-07-22;修回日期:2013-08-29)

(本文编辑:张仲书; 英文编辑:王建东)

(上接第 555 页)

### 3 讨论

《医学源流论》言:“煎煮之法最宜深讲,药之效不效,全在乎此。”正确掌握中药的煎煮方法是保证中药临床疗效的重要环节,特殊中药必须采用特殊的煎煮方法才能达到预期的效果。《药典》特殊中药煎法的有了初步的规定,但不够清晰,不好掌握尺度,操作性不强。

**3.1 宜先煎、不宜久煎的使用欠清晰** 自然铜《药典》用法用量规定为宜先煎,“宜”具有适合、适当,应当、应该的意思。宜先煎可理解为应当或应该先煎,或者是最好先煎,但同时亦包含有不先煎也可以的含义;不宜久煎,可以理解为不应该或不适合久煎。高学敏编著的《中药学》<sup>[2]</sup>教材认为不宜久煎的药物应采用后下的煎煮方式。这里的不宜久煎是否等同于后下? 鱼腥草不宜久煎,是单煎时不宜久煎,还是与他药共煎时不宜久煎,亦或者是应该按后下的煎煮方式操作,《药典》没有明确。再者,大黄用于泻下时不宜久煎亦是如此。

**3.2 久煎、后下的具体时间有待明确** 适宜的煎煮时间对保证中药汤剂的疗效至关重要。制草乌、制川乌及附子《药典》规定为先煎、久煎,但并没有规定具体时间。常规认为先煎的时间一般为 30 min,先煎、久煎的时间一般为 60 min 左右。《中药学》<sup>[2]</sup>教材认为先煎、久煎以 45 ~ 60 min 为宜。《中华本草》记载有毒性药物的先煎时间为 60 ~ 120 min<sup>[3]</sup>。45 min 与 120 min 相差接近 3 倍。后下的目的是为了减少挥发油的损耗,避免有效成分分解破坏。常规操作是在中药汤剂煎好前 5 ~ 10 min 入药。研究发现豆蔻<sup>[4]</sup>在浸泡后下煎煮 1 min 左右时,汤剂中挥发油含量最高;砂仁<sup>[5]</sup>捣碎单包浸泡 30 min 后,在第一火离火前 2 min 后下,第二火时将砂仁包先取出,不与其他方药混煎,也在第二火离火前 2 min 后下,汤剂中挥发油含量最高。钩藤捣碎,浸泡 30 min,煎 2 次,每次煎煮 15 min,所得汤液生物碱煎出量最高,煎 20 min 以上其降压成分易破坏<sup>[6]</sup>。葛尔宁等<sup>[7]</sup>研究认为易挥发芳香类后煎药的煎药时间控制在 3 min 内比较合适,以生物碱

为主要成分的后煎药,煎药时间控制在 10 ~ 15 min 比较合适。由此可见,后下时间的不同直接影响有效成分的煎出含量。由于药物的性能、特点不尽相同,若能对特殊药物的煎煮时间加以明确,则能最大限度地煎出和保留药物的有效成分、降低药物的毒性。另外,后下是浸泡后下,还是直接后下等《药典》亦没有明示。

**3.3 水牛角宜先煎 3 h 以上实践操作困难** 水牛角用法用量项下规定宜先煎 3 h 以上,是本版药典唯一注明先煎具体时间的药物。笔者认为在久煎水牛角 3 h 后加上与他药共煎,累计煎药将达到或超过 5 h,对于普通患者来说操作亦有困难。目前普遍还是按先煎、久煎的煎煮方式处理。再者现在医院药房及多数中药店都使用煎药机煎药,单方煎煮达 4 ~ 5 h,执行起来亦有困难。

笔者建议,《药典》在宜先煎、不宜久煎方面应进一步清晰定性,在久煎与后下的具体操作时间上以及后下的具体操作方式等方面应该进一步明确,只有这样才能更好地指导实践操作。

### 【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 2010 版[S]. 一部,北京:中国医药科技出版社,2010.

[2] 高学敏. 中药学[M]. 2 版. 北京:中国中医药出版社,2007:44.

[3] 国家中医药管理局. 中华本草[M]. 第 1 卷. 上海科学技术出版社,1999:215.

[4] 赵海峰,贺少堂,杨荣利,等. 煎煮方法对砂仁、豆蔻挥发油煎出率的影响[J]. 陕西中医,1996,17(10):472-472.

[5] 柴 烨,武小荣,刘峰林. 砂仁的规范煎煮方法研究[J]. 甘肃医药,2011,30(7):429-431.

[6] 柴 烨,杨富荣,刘峰林. 钩藤煎煮方法研究[J]. 甘肃医药,2010,29(5):569-571.

[7] 葛尔宁,盛振华,朱飞叶,等. 后下中药饮片有效成分的煎出量及变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(5):42-45.

(收稿日期:2013-07-24)

(本文编辑:潘雪飞)